

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Biologie



Jan Poledňák

Mechanismy a aplikace translokace makromolekul přes membrány eukaryotických buněk
účinkem bakteriálních toxinů

Mechanisms and applications of macromolecule translocation across membranes of eukaryotic
cells by bacterial toxins

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.8.2015

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat především svému školiteli RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D. za cenné rady, inspiraci a odborné vedení při psaní této práce. Také bych rád poděkoval všem členům Laboratoře fyziologie bakterií na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy za vřelé přijetí a za pomoc a rady při experimentální práci. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za jejich podporu.

Abstrakt

Translokace toxinů přes cytoplazmatickou membránu eukaryotických buněk je důležitým faktorem virulence bakterií způsobujících onemocnění eukaryotickým organismům. Toxiny translokují své vlastní domény s toxickou aktivitou dovnitř buňky nebo vytvoří v její membráně pór, kterým mohou procházet další molekuly od iontů až po DNA, RNA nebo proteiny. Studium translokace těchto látek umožňuje charakterizovat jeho mechanismus a také i vlastnosti pórotvorných toxinů. Několik těchto toxinů je natolik detailně popsáno, že po úpravě cílenou mutagenézí se dají využívat pro určování vlastností přenášených molekul. Jednou z takových aplikací je např. měření průchodu nukleotidů i celých vláken nukleových kyselin přes membránový kanál vytvářený α -hemolysinem *S. aureus*. Tato metoda si v současné době našla uplatnění při sekvenaci DNA.

Klíčová slova: translokace, bakteriální toxiny, plasmatická membrána, nanopórové sekvenování

Abstract

Toxin translocation across the cytoplasmic membrane of the eukaryotic cell is a potent virulence factor of bacteria causing disease to eukaryotic organisms. Toxins translocate their domains responsible for the toxic activity inside the cell or create pores in cell membrane allowing the transmembrane traffic of ions, DNA, RNA or proteins. Knowledge of the toxin translocation process enables to characterize the mechanism and also the properties of the pore-forming toxin. Some of these toxins have been described in such a detail that were changed using site-directed mutagenesis and can serve as tools for characterization of the translocated molecules. One of such examples is the transfer of nucleotides or the whole nucleic acid molecules across the membrane through the pore of *S. aureus* α -hemolysine. Nowadays, this application is commercially used for DNA sequencing.

Keywords: translocation, bacterial toxins, plasmatic membrane, nanopore sequencing

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	4
Obsah	5
Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	7
2. Jednomolekulový systém translokace toxinu	7
3. Dvoumolekulové komplexy A-B toxinů	9
3.1 Receptory toxinů na povrchu buněk a jejich úloha	10
3.2 Shiga toxin	11
3.3 Diphtheriový toxin	14
3.4 Botulotoxin	16
4. In vitro systémy pro výzkum translokace	17
4.1 α -hemolysin	17
4.2 Nanopórové sekvenování	21
4.2.1 Biologické nanopóry	21
4.2.2 Nanopóry v pevné membráně	22
4.2.3 Hybridní nanopóry	22
4.2.4 Detekce a záznam signálu	24
4.3 Anthrax toxin	25
5. Závěr	29
6. Použitá literatura	30

Seznam použitých zkratk

α -HL – alfa-hemolysin (*Staphylococcus aureus*)

AC – adenylát-cyklázová doména adenylát cyklázového toxinu

ATP – adenosintrifosfát

BLM - černé lipidické membrány

CaM - kalmodulin

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CyaA – adenylát cyklázový toxin (*Bordetella pertussis*)

DIB - dvojvrstva na rozhraní kapičky

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DTRAP 27 – protein 27 asociovaný s receptorem pro difterický toxin (diphtheria toxin receptor associated protein 27)

EF – edémový faktor (*Bacillus anthracis*)

Gb3 – globotriaosylceramid

GM1 – monosialotetrahexosylgangliosid

GTP – guanosintrifosfát

HlyA – hemolysin A (*Escherichia coli*)

LF – letální faktor (*Bacillus anthracis*)

M_r – molekulová hmotnost

PA – protektivní antigen (*Bacillus anthracis*)

PDI – protein disulfid isomeráza

ProHB-EGF – prekurzor pro epidermální růstový faktor vázající hemoglobin

RNA – ribonukleová kyselina

RTX toxiny – označení skupiny toxinů (Repeats in Toxins)

SDS – Dodecylsírán sodný

Syk – tyrosinová kináza (spleen tyrosin kinase)

TISS – sekrece typu I (Type I Secretion System)

1. Úvod

Bakteriální toxiny schopné translokace přes eukaryotickou membránu jsou důležitým virulenčním faktorem. Naše laboratoř se věnuje výzkumu pórotvorných toxinů jako jsou adenylát cyklázový toxin (CyaA) (*Bordetella pertussis*), hemolysin A (HlyA) (*Escherichia coli*), α -hemolysin (α -HL, *Staphylococcus aureus*), exotoxin ApxIA (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) a kolicin U (*Shigella boydii*). Proto bych se v této práci chtěl zaměřit na mechanismy translokace látek přes buněčné membrány a dalšímu aplikovanému využití translokace na umělých membránách. V poslední době se podobných toxinů využívá pro dopravu antigenů do buněk imunitního systému, pro sledování translokace makromolekul (sítě kapiček a hydrogelu) a dokonce i pro sekvenování DNA a RNA.

Cílem této práce je stručně shrnout vědomosti o mechanismech translokace makromolekulární látky (jako jsou proteiny, nukleové kyseliny nebo oligosacharidy) přes fosfolipidovou membránu eukaryotních buněk a jejich možných aplikacích. Systémy in vitro založené na vlastnostech těchto toxinů jsou využívány i pro charakterizaci přenášených molekul a objasnění mechanismu působení použitých toxinů na úrovni základního výzkumu.

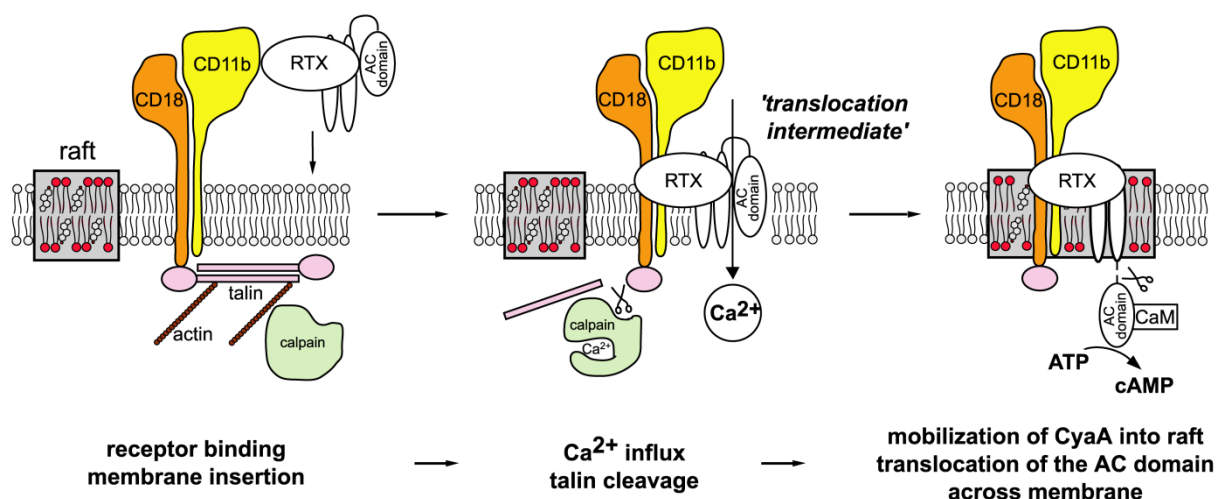
2. Jednomolekulový systém translokace toxinu

Do této skupiny se dají zařadit toxiny skládající se pouze z jedné podjednotky, která má vazebnou, translokační i enzymatickou aktivitu na jednom řetězci. Nejvýznamnějším členem této skupiny je adenylát-cyklázový toxin.

Adenylát-cyklázový (CyaA) toxin je významným faktorem virulence bakterie *Bordetella pertussis* jako původce černého kašle. Protein je složen z 1706 aminokyselin. Adenylát-cyklázová doména (AC) se nachází na N-konci a je dlouhá 400 aminokyselin a na C-konci je 1306 aminokyselin dlouhá hemolysinová doména. Mezi residui 500 a 750 se nachází hydrofobní segmenty, které zaujímají α -helikální strukturu, aby se vnořily do membrány a přitom vytvořily kationt selektivní póry, odpovědné za hemolytickou aktivitu toxinu. C-konec (aminokyseliny 1000 až 1706) je zodpovědný za vazbu toxinu na specifický receptor cílové buňky – $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18) (Guermonprez et al. 2001). V této oblasti (residua 1014 – 1613) se také nachází přibližně 40 kopií vazebných míst pro vápenaté ionty, které jsou rozděleny do 5 bloků nonapeptidových repetací, které jsou charakteristické

pro RTX toxiny. Poslední dva bloky repetice byly v Laboratoři fyziologie bakterií vykryštalizovány a vytvářejí strukturu typickou pro RTX proteiny, takzvaný β -roll (Motlová, nepublikované výsledky). CyaA toxin je exprimován ve formě neaktivního prekurzoru, který je aktivován specifickou acylací dvou lysinů – Lys⁸⁶⁰ a Lys⁹⁸³ (Barry et al. 1991). Následně je sekretován sekrečním systémem typu I (TISS) přes plasmatickou a vnější membránu bakterie. Toxin se v hostiteli váže na myeloidní fagocytické buňky exprimující $\alpha_M\beta_2$ integrin CD11b/CD18. Tento toxin je unikátní tím, že je schopen invaze i přes to, že integrin není přítomen v buňce, i když s asi 100krát menší účinností (Eby et al. 2010). Proces translokace enzymatické domény je závislý na přítomnosti vápenatých iontů a negativním membránovém potenciálu (Rogel a Hanski 1992; Otero et al. 1995; Veneziano et al. 2013).

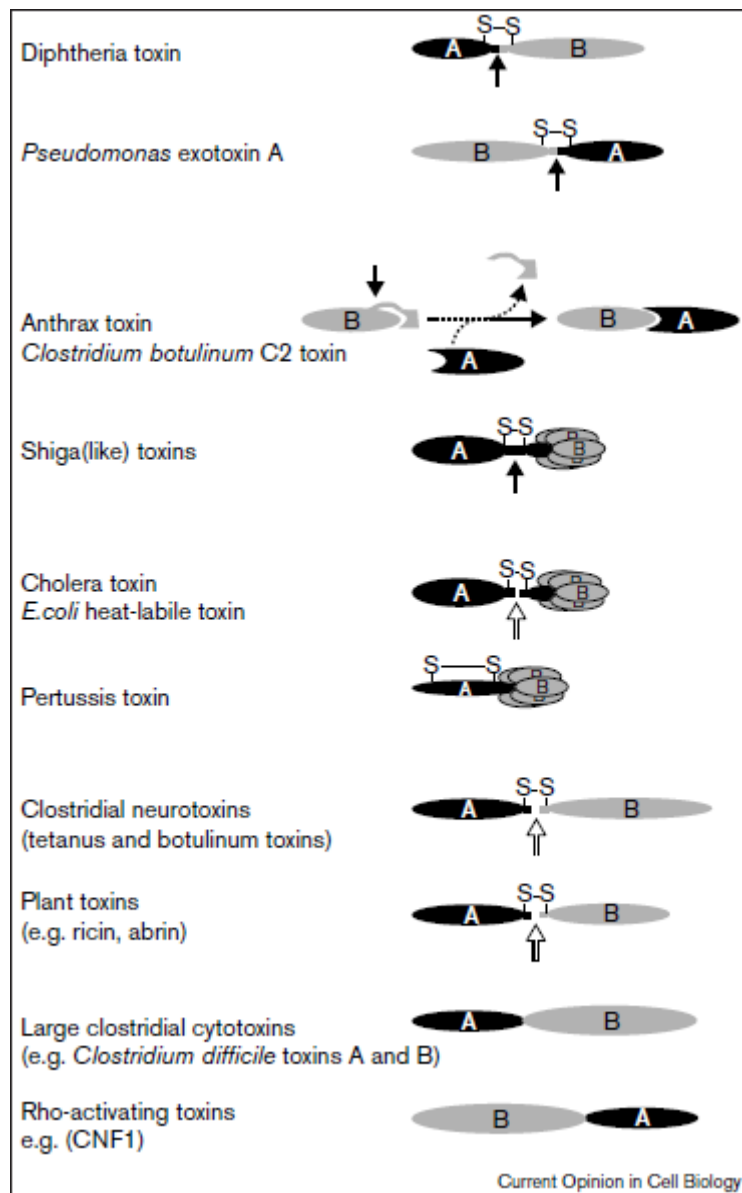
CyaA toxin se váže na integrinový receptor CD11b/CD18 v cytoplasmatické membráně makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk. Tento receptor je rozptýlen v membráně mimo lipidické rafty a má cytoplasmatický konec podjednotky CD18 navázaný na aktinové řetězce přes propojující protein talin. Po vazbě na receptor se translokační intermediát (translocation intermediate) CyaA toxinu zasune do lipidické dvojvrstvy buněčné membrány. Translokační intermediát je označení stavu, kdy je do lipidické dvojvrstvy zasunuta částečně AC doména spolu s pórotvorným segmentem, který se podílí na vytvoření přechodně otevřené dráhy pro Ca^{2+} skrz buněčnou membránu. Přísun iontů Ca^{2+} z vnějšího prostředí má za následek aktivaci Ca^{2+} dependentních proteáz (kalpainů) nacházejících se v cytosolu buňky, které odštěpí komplex CyaA-CD11b/CD18 od aktinového vlákna. V důsledku odštěpení se tento komplex přesune do lipidového raftu s vysokým obsahem cholesterolu, kde je translokace AC domény přes buněčnou membránu dokončena. V cytosolu může být AC doména odštěpena kalpainem od hemolysinové domény (Uribe et al. 2013). Odštěpení AC domény není podstatné pro spuštění aktivity, ale pouze určí, zda bude AC doména volně v cytosolu nebo bude stále navázaná na hemolysinovou doménu. Následná vazba kalmodulinu (CaM) spustí AC enzymatickou aktivitu – neregulovatelnou přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) (Obr. 1) (Bumba et al. 2010).



Obr. 1 Translokace CyaA přes buněčnou membránu. Prvním krokem je vazba na integrinový receptor CD11b/CD18, který se nachází mimo lipidický raft a CD18 je navázaná na aktinový cytoskelet pomocí linkeru proteinu talin. Poté dojde k zasunutí translokačního intermediátu do membrány, následný přísun Ca^{2+} z vnějšího prostředí vede k aktivaci kalpainu, který odštěpí komplex CyaA-CD11b/CD18 od aktinového vlákna. Po odštěpení se tento komplex přemístí do lipidického raftu s vysokým obsahem cholesterolu, ve kterém je dokončena translokace AC domény. Po navázání CaM je spuštěna enzymatická aktivita AC domény (Bumba et al. 2010).

3. Dvoumolekulové komplexy A-B toxinů

AB toxiny se skládají ze dvou podjednotek (Obr. 2). Podjednotka A s toxickou aktivitou vede ke změně fyziologie buňky nebo až k její smrti. Podjednotka B zajišťuje navázání toxinu k receptoru na plazmatické membráně a může hrát roli i při translokaci podjednotky A do cytosolu cílové buňky. Mezi vnitrobuněčné cíle těchto toxinů patří například aktin, ribozomy, nebo malé GTP-vazebné proteiny jako Rho nebo G-proteiny. V této práci se nevěnuji všem toxinům této skupiny, ale pouze těm, u kterých jsou mechanismy působení prozkoumány nejpodrobněji.



Obr. 2 Přehled struktur jednotlivých dvoupodjednotkových AB toxinů (Falnes a Sandvig 2000).

3.1 Receptory toxinů na povrchu buněk a jejich úloha

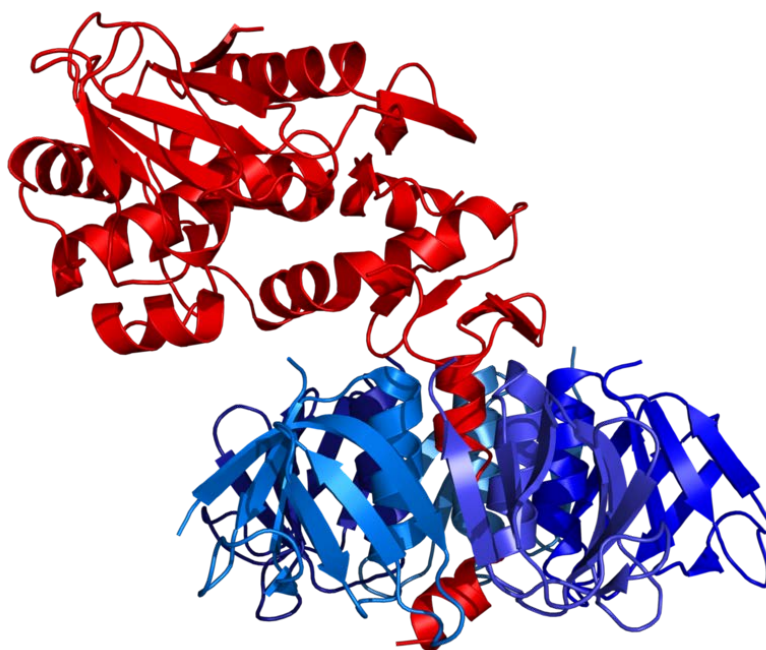
AB toxiny mají ve většině případů specifický receptor na povrchu cílové buňky. Receptorem pro difterický toxin je nerozštěpený prekurzor pro heparin-vazebný růstový faktor EGF (ProHB-EGF) (Naglich et al. 1992), pro Shiga toxin je receptorem globotriaosylceramid (Gb3) (Lindberg et al. 1987) a pro cholera toxin je to monosialotetrahexosylgangliosid (GM1) (Holmgren et al. 1975). Kromě vazby toxinu mohou mít receptory i další úlohy. Za prvé mohou mít přímou úlohu při penetraci toxinu skrz membránu – pro difterický toxin je to nezbytná vlastnost, a pokud zaměníme transmembránovou nebo cytoplasmatickou doménu receptoru za GPI-kotvu, dojde ke snížení

nebo zablokování pórtovorné aktivity, čímž se potvrzuje, že receptor hraje nezbytnou roli při translokaci toxinu (Lanzrein et al. 1996). Za druhé receptory určují cílovou organelu pro toxin ještě před jeho vlastním vstupem do cytosolu, např. lipidové složení receptoru pro Shiga toxin je esenciální pro retrográdní transport toxinu (Arab a Lingwood 1998). A za třetí, když je receptor umístěn v klathrinové jamce, toxin je endocytován mnohem rychleji, než kdyby se nacházel v planární membráně.

3.2 Shiga toxin

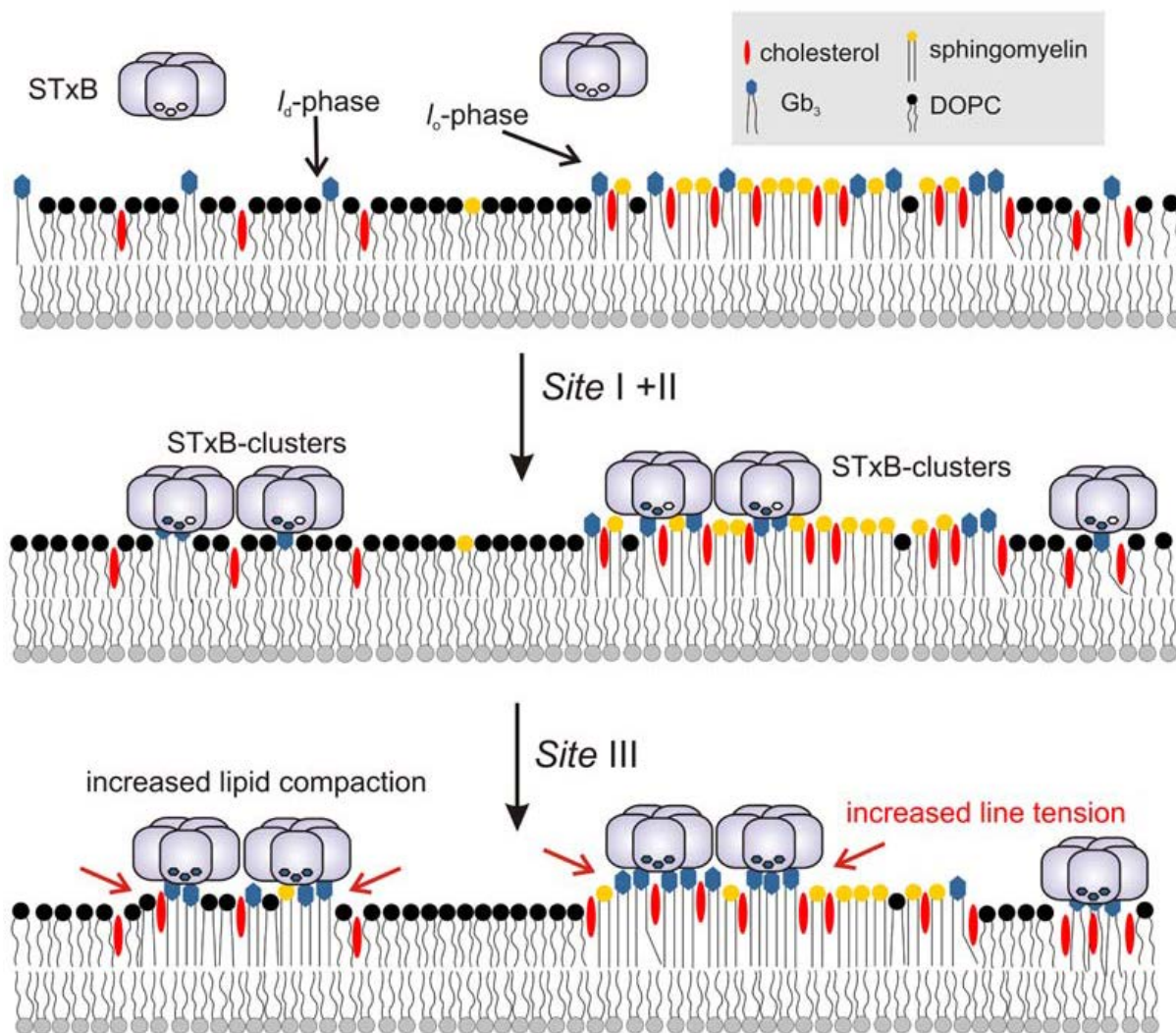
Toxinů, které jsou dopravovány přímo skrze membránu (*Bordetella pertussis* – adenylát-cyklázový toxin) není mnoho, většina z nich je nejprve endocytována. Mezi takové patří Shiga toxin, který bude příkladem pro vysvětlení procesu endocytózy a retrográdního transportu.

Shiga toxin má AB₅ strukturu, což znamená, že k podjednotce A je navázáno 5 domén podjednotky B, přesněji k C-konci podjednotky A (Obr. 3). Podjednotka A má enzymatickou aktivitu, účinkuje jako N-glykosidáza odštěpující adenin na 28 S ribozomové podjednotce způsobující inhibici proteosyntézy, pro funkci Shiga toxinu je proto nezbytné translokovat jeho doménu A přes membránu. Podjednotka A obsahuje sekvenci Arg248-Val-Ala-Arg251, kterou rozeznává furin a v tomto místě způsobí rozštěpení podjednotky A na domény A1 a A2, které ale stále zůstanou spojeny disulfidickou vazbou. Doména A2 zůstává navázána na povrch membrány cílové buňky, zatímco doména A1 s toxickou aktivitou je transportována dovnitř buňky. Tento proces je nezbytný pro aktivaci toxinu v napadené buňce (Garred et al. 1995).



Obr. 3 Schéma struktury Shiga toxinu. Podjednotka A je označena červeně a podjednotka B tvořená pentamerem je označena modře. Pentamer je navázán na C-konec podjednotky A – doména A1 (PDB 1R4P) (Fraser et al. 2004).

Navázání toxinu na receptor se jeví jako komplexní proces, protože každá z pěti domén podjednotky B Shiga toxinu má tři vazebná místa pro receptor Gb3. Z nich pouze dvě mají vysokou afinitu k receptoru, zatímco třetí vazebné místo slouží k nahromadění Gb3 v dostatečném množství, aby se mohl na membráně vytvořit shluk molekul cholesterolu. Tyto shluky se spojují dohromady a vytváří větší, těsně navázané domény, které zvyšují pnutí membrány a způsobují její prohnutí dovnitř. Tento stres na lipidické membráně může být hnací silou k endocytóze nezávislé na klathrinu (Obr. 4) (Windschiegl et al. 2009).



Obr. 4 Schématické zobrazení vazby Shiga toxinu na membránu. Vazebné místo I a II slouží k navázání toxinu k receptoru Gb3 a vazebné místo III zajišťuje dostatečné množství Gb3 pro vytvoření clusteru a zvýšení pnutí membrány (Windschiegl et al. 2009).

Při vazbě toxinu hraje důležitou roli nejen podjednotka B, ale především podjednotka A, která sama o sobě stimuluje přenos přes cytoplazmatickou membránu závislou na klathrinu. Toxin samotný se preferenčně váže na receptory Gb3 v klathrinových jamkách. Podjednotka A interaguje s membránovými proteiny, především s tyrosin-kinázou (Syk), která fosforyluje klathrin a zvyšuje tak množství klathrinových jamek. Endocytóza závislá na klathrinu je podstatně účinnější než endocytóza nezávislá na klathrinu (Torgersen et al. 2005).

Dalším krokem je přesun Shiga toxinu časným endosomem, popř. pozdním endosomem do Golgiho aparátu. Jeho cesta endosomy a interakce s membránami Golgiho aparátu je překvapivě rychlá, pohybuje se v řádu jednotek minut. Po transportu do Golgiho aparátu se toxin už nehromadí v organelách pozdní endosomální dráhy po vlastním přenosu

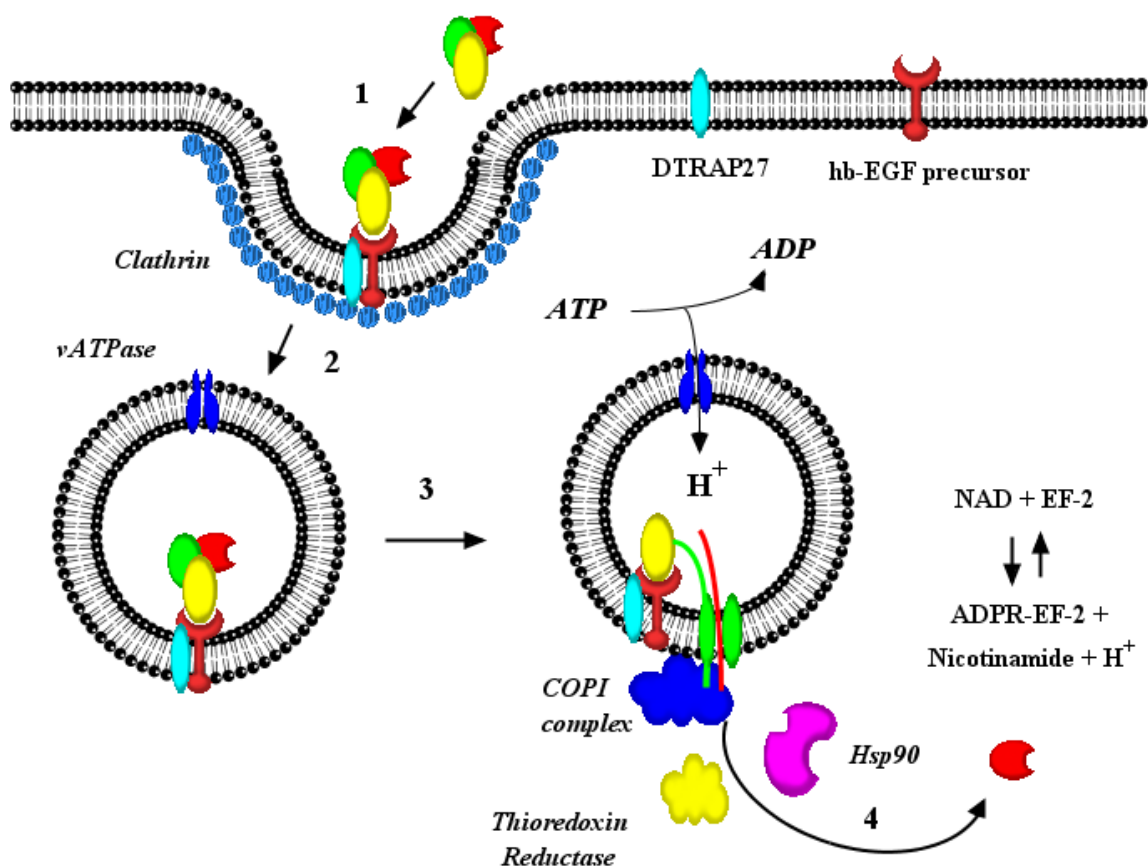
z časného, popř. pozdního endosomu (Mallard et al. 1998). Za zpomalením této dráhy by mohla být inhibice enzymů PKC δ , p38 a cPLA₂ α , které využívá toxin pro transport endosomu do Golgiho aparátu. Nejsilnějším inhibítozem transportu je látka ONO-RS-082, inaktivující PLA₂. Na transport toxinu má též vliv pH, snížení hladiny lysosomální V-ATPázy zodpovědné za acidifikaci endosomů, nebo přidání bafilomycinu, který je inhibítozem V-ATPázy. Naopak chloroquin, který také ovlivňuje pH endosomu, neblokuje transport toxinu do Golgiho aparátu. Dalším inhibítozem je molekula Retro-2 a její deriváty, které inhibují transport endosomů, ale nemají vliv na jejich morfologii a neblokují tak transport endogenních markerů jako TGN46 nebo CI-M6PR (Noel et al. 2013).

Po retrográdním transportu Golgiho aparátem do endoplasmatického retikula dochází k disociaci podjednotek A a B pomocí protein disulfid isomerázy (PDI), která působí v hydrofobní oblasti mezi doménou A1a podjednotkou B. Disulfidická vazba mezi doménami A1 a A2 (residua 248 – 251) je redukována vnitřním prostředím lumenu endoplasmatického retikula. Následně spontánně rozbalená doména A1 interaguje s chaperony Hsp40 a ERdj3, které spolu se Sec61 translokují A1 doménu přes membránu endoplasmatického retikula (Yu a Haslam 2005). Translokaci toxinu z endosomu podrobně vysvětlím na příkladu difterického toxinu (viz kapitola 3.3), protože je zde detailněji prozkoumaná.

3.3 Difterický toxin

Difterický toxin, jehož producentem je bakterie *Corynebacterium diphtheriae*, způsobuje onemocnění zvané záškrt. Toxin jako člen AB toxinů je tvořen dvěma podjednotkami - A a B. Podjednotka B se váže na membránový receptor – ProHB-EGF. Tato vazba může být zesílena asociací receptoru s proteinem DTRAP 27 (diphtheria toxin receptor associated protein 27), což je homolog lidského glykoproteinu CD9. Vazba toxinu na receptor je situována do klathrinových jamek, které jsou později změněny na časné endosomy. Pro úspěšnou translokaci toxinu je potřeba nízké pH v endosomu, kde se obě podjednotky toxinu rozbalí, aby se uvolnily hydrofobní domény pro zesílení interakce s membránovými lipidy. V podstatě nízké pH uvnitř endosomu spouští translokaci toxinu do cytosolu. Pomocí krystalizace difterického toxinu v prostředí modelové membrány za kyselého pH bylo prokázáno, že protonace způsobuje rozbalení tří α -helixů transmembránové domény, čímž dojde k odhalení hydrofobní oblasti proteinu a zpřístupnění interakce s hydrofobní oblastí membrány (Leka et al. 2014).

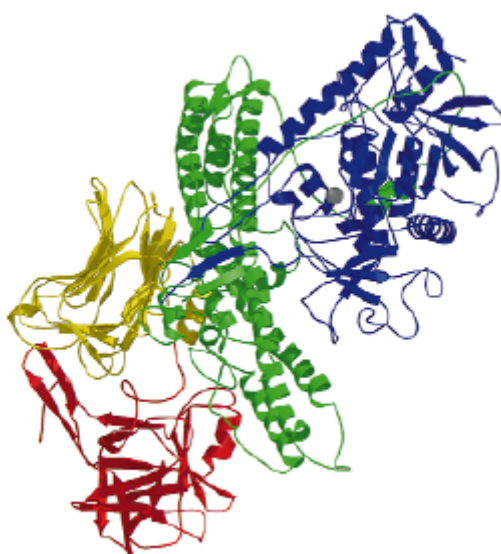
Po rozbalení toxinu dochází k inserci translokační domény B podjednotky, který vytvoří v endosomální membráně pór široký 18 – 22 Å. Samotná inserce translokační domény je iniciována protonací kyselých aminokyselin Glu³⁴⁹ a Asp³⁵³ na hrotu vlásenky mezi helixy 8 a 9 (TH8/9). N-koncová část translokační domény a C-koncová část fragmentu A jsou translokovány skrz membránu, translokace se účastní COPI komplex, který umožní vtažení těchto částí pórem, disulfidický můstek spojující tyto dvě části je redukován vlivem prostředí uvnitř cílové buňky. Posledním krokem je dokončení translokace zbylé části podjednotky A za asistence thioredoxin reduktázy, a následné sbalení chaperonem Hsp90 (Obr. 5) (P. Falnes et al. 1994; Silverman et al. 1994). Dokonce samotná transmembránová doména B podjednotky má vlastnost chaperonu, protože udržuje A řetězec (katalytickou doménu) ve správné orientaci a je zodpovědná za jeho translokaci skrz membránu (Hayashibara et al. 2005).



Obr. 5 Schéma mechanismu translokace difterického toxinu do cytosolu eukaryotické buňky. 1) Toxin se váže na receptor na povrchu cytoplazmatické membrány a 2) je vtažen do klathrinové jamky, která vytvoří časný endosom. 3) Vlivem vnitřního pH lumenu, které reorganizuje celý toxin, se spustí inserce translokační domény B podjednotky, která vytvoří pór v membráně, kterým 4) se translokuje katalytická doména za účasti COPI komplexu, thioredoxin reduktasy a Hsp90. Po opětovném sbalení do aktivní konformace provádí toxin ADP-ribosylaci elongačního faktoru 2 (EF2). Difterický toxin je označen: červená pro katalytickou doménu, zelená pro transmembránovou doménu a žlutá pro receptor vazebnou doménu (Murphy 2011).

3.4 Botulotoxin

Botulotoxin, další významný člen AB toxinů, je toxin produkovaný bakterií *Clostridium botulinum*. Botulotoxin je považován za nejúčinnější jed, který známe. Smrtelná dávka je 1,3 – 2,1 ng/kg při nitrožilním podání a 10 – 13 ng/kg při inhalaci. Nejčastější intoxikace ovšem nastává při pozření spor *C. botulinum*, které jsou obsaženy ve špatně konzervovaných pokrmech. Toxin způsobuje onemocnění zvané botulismus. Protein je tvořen dvěma řetězci – lehkým a těžkým, které jsou spojeny disulfidickým můstkem a tvoří tři funkční domény proteinu. Je to 1) vazebná, 2) katalytická, a 3) pórtvorná a translokační doména (Obr. 6).



Obr. 6 Struktura botulotoxinu. Katalytická doména má modrou barvu, translokační doména je zeleně, N-koncová sub-doména protein vazebné domény je žlutě, C-koncová sub-doména protein vazebné domény je červeně a zinek vazebné místo je šedě. Helixy translokační domény se spirálovitě točí kolem sebe a okolo nich je navázána katalytická doména (Lacy et al. 1998).

Receptor vazebná doména je tvořena ze dvou zhruba stejně velkých sub-domén, které jsou tvořeny především β -listy a jsou navzájem spojené jedním α -helixem. Receptor vazebná doména se nachází daleko od α -helixů translokační domény a vůbec se jí nedotýká, a proto se všechny smyčky na povrchu mohou účastnit vazby na receptor. Translokační doména má ve své střední části dva centrální α -helixy dlouhé 105 Å a kolem nich se balí katalytická doména a to ještě předtím, než se zformuje hlavní tělo toxinu cylindrického tvaru. α -helixy se točí kolem sebe do spirály. Tato podobná struktura se nachází i u kolicinu Ia a u chaperonu GrpE. α -helixy jsou antiparalelní a amfipatické. Katalytická doména je tvořena α -helixy i β -listy. Aktivní místo domény je zanořeno 20-24 Å dovnitř proteinu, má negativní náboj a je

zpřístupněno kanálem, který je chráněn jak hlavní částí domény, tak i jejím opaskem, který se vine kolem translokační domény (Lacy et al. 1998; Kumaran et al. 2009).

Botulotoxin B je aktivní, pokud je v heterodimerní formě a je redukován disulfidický můstek mezi dvěma řetězci. Těžký řetězec je zodpovědný za vazbu proteinu k receptoru v klathrinové jamce neurální buňky, poté je toxin endocytován. Inzerci lehkého řetězce do membrány endosomu obstarává těžký řetězec a následně je spuštěna jeho enzymatická aktivita. Proteázová aktivita je lokalizována na lehkém řetězci a je specifická pouze pro SNARE proteiny, proteiny malých synaptických vezikulů. Jejich štěpením se redukuje uvolňování neurotransmiteru (Schiavo et al. 1992).

Botulotoxin se páruje s netoxickým nehemaglutininovým proteinem za vytvoření funkčního toxického komplexu, který chrání botulotoxin v zažívacím traktu před proteolýzou. Tvorba tohoto komplexu je závislá na pH prostředí. Při pH 8 zaujímají proteiny konformaci, která neumožňuje párování do komplexu. Při změně okolních podmínek na pH 6 se ukazuje, že botulotoxin konformaci sice již nemění, ale nehemaglutininový protein konformaci změní, a tím je umožněno párování do komplexu zajišťující ochranu pro botulotoxin a jeho funkční stav (Matsui et al. 2014).

4. In vitro systémy pro výzkum translokace

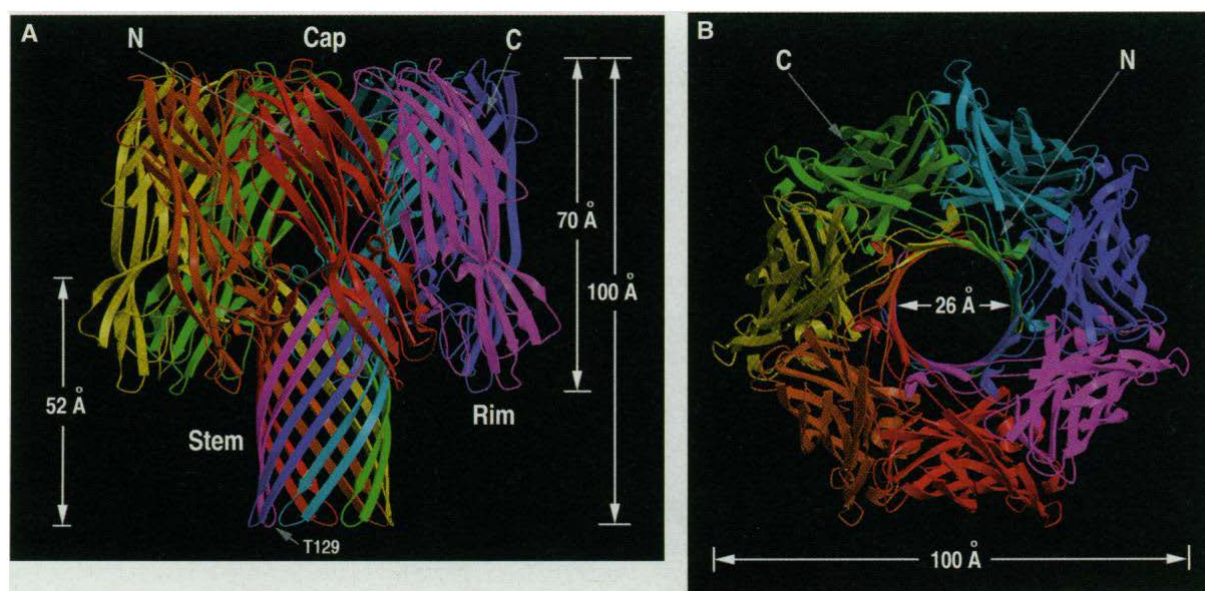
4.1 α -hemolysin

α -hemolysin (α -HL) sekretovaný bakterií *Staphylococcus aureus* způsobuje lyzi buněk. Napadá především krevní buňky – červené krvinky, monocyty, krevní destičky, lymfocyty a endoteliální buňky (Bhakdi a Tralum-Jensen 1991, Thelestam a Blomqvist 1988). Není to člen skupiny AB toxinů, tedy netranslokuje žádnou svoji část, ale vytváří póry, kterými mohou procházet jiné molekuly. Dále vysvětlím translokaci skrze α -HL společně s detailním popisem jeho struktury, což je důležité pro lepší pochopení jeho využití při sekvenaci nukleových kyselin.

α -HL tvoří membránový pór, který má hříbovitý tvar, jehož rozměry jsou 100 Å na výšku a 100 Å na šířku. Pór je tvořen sedmi monomery (Gouaux et al. 1994). Protein je rozdělen na tři základní části, kterými jsou čepička (cap), kmen (stem) a lem (rim) (Obr. 7). Protein je na membránové dvojvrstvě orientován tak, že čepička a lem jsou na povrchu fosfolipidové membrány a kmen je zanořen do membrány a tvoří transmembránový kanál.

Čepička je tvořena sedmi „ β sandwich“ strukturami. Každá z nich se skládá z β -listů postavených proti sobě a dohromady tak tvoří β -barel. Lem vyčnívá ze spodní části čepičky a je v těsné blízkosti, nikoli v přímém kontaktu s fosfolipidovou membránou. Mezi kmenem a lem se nachází trhlina, která vymezuje oblast bohatou na aminokyseliny, které se podílejí na interakci mezi proteinovým lemem a hlavičkami fosfolipidů nebo receptorů na povrchu fosfolipidové membrány. Rozsáhlé plochy povrchu kontaktu hydrofobních a hydrofilních částí na povrchu jednotlivých protomerů způsobují pevnost a stabilitu celého heptameru. Protomery jsou spojeny aminokyselinami, které jsou do sebe zaklesnuté. Je s podivem, že delece pouhých dvou aminokyselin vede k inaktivaci hemolytické aktivity, přestože jednotlivé aminokyseliny v této oblasti nemají esenciální roli v proteinu. Konzervativní substituce na pozici His₃₅ vede ke snížení oligomerizační, lytické, a letální aktivity, zatímco nekonzervativní substituce všechny tyto aktivity zcela ruší (Song et al. 1996).

Protomerové jádro je tvořeno asi 80 % všech aminokyselin. Jádro je elipsovitého tvaru o rozměrech 70 x 45 x 20 Å. Struktura protomerů se podle krystalografie liší jen o 0,24 Å. Každý protomer obsahuje 16 β listů, 3 krátké úseky α helixů, dlouhý náhodně spletený úsek Asp¹⁸³ až Lys²⁰⁵ a značnou část „non α “ a „non β “ struktur (Song et al. 1996).

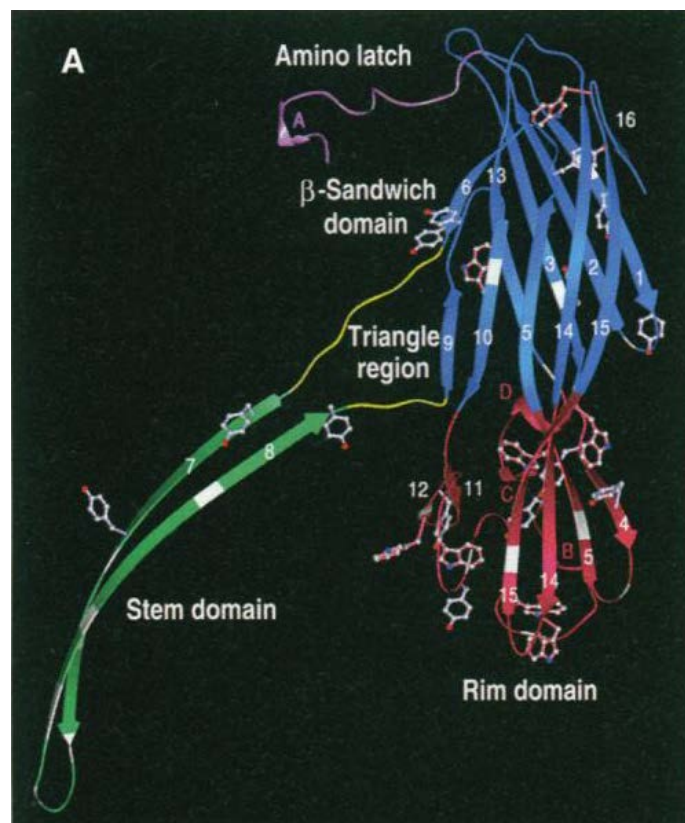


Obr. 7 Krystalová struktura zobrazuje heptamer α -hemolysinu jinou barvou pro každý protomer. Vyznačeny jsou části: čepička (cap), kmen (stem) a lem (rim). Vlevo je boční pohled na protein a vpravo je pohled shora na heptamer (Song et al. 1996).

Transmembránový kmen tvořící kanál je složen ze 14 antiparalelních β skládaných listů, jeden pár pro každý protomer. Vlákná kmenu začínají na Lys¹¹⁰ a končí na Tyr¹⁴⁸. Tato vlákna tvoří β skládaný barel o výšce 52 Å a průměru 26 Å. Každé vlákno se v barelu otočí přibližně o 180° okolo β barelu. Průměr kanálu není v celé délce proteinu stejný, v nejširším místě má průměr 46 Å a v nejužším místě měří 15 Å. Nejširší bod se nachází na vrcholu trojúhelníkové oblasti (Obr. 8), přesněji na Pro¹⁰³. Nejužší bod se nachází v místě spojení kmenové domény a trojúhelníkové oblasti. V β barelu má kanál průměr od 14 do 24 Å v závislosti na množství postranních řetězců aminokyselin kmenové domény. Horní i spodní okraj kmenu je tvořen ze zásaditých a kyselých residuí, zatímco vnitřek je složen z neutrálních aminokyselin (Song et al. 1996).

Na horní vnitřní hraně čepičky – na hraně vstupu do proteinu se nachází aminokyseliny, které mají úlohu při interakci nukleotidu s α -HL a jeho následný průchod proteinem. Jsou to Lys⁸, Ile¹⁶, Asn¹⁷, Thr¹⁸, Lys⁴⁶ a Asp⁴⁷, které nejčastěji interagují s nukleotidem, který se přibližuje k proteinu a následně je vtažen do transmembránového kmene (Manara et al. 2015).

Trojúhelníková oblast je spojení mezi jádrem protomeru a kmenovou doménou (Obr. 8). Odděluje je od sebe a zároveň interaguje s oblastmi sousedních protomerů vytvořením vodíkových vazeb mezi polárními aminokyselinami: Lys¹¹⁰ (B) – Asp¹⁵²(C) – Asn¹⁷³(C) a Lys¹⁴⁷(B) – Glu¹¹¹(B) – Glu¹¹¹(A) (písmeno označuje protomer v řadě tří protomerů A, B, C) (Song et al. 1996).



Obr. 8 Stuhový model protomeru α -hemolysinu. Modrou barvu má doména v čepičce, červená zobrazuje doménu v lemu, zelená v β -barelu a žlutá pro trojúhelníkovou oblast oddělující kmenovou doménu od čepičkové domény a šedě označené aminokyseliny jsou Tyr, Trp a Gly (Song et al. 1996).

Toxin je z buňky vylučován v podobě ve vodě rozpustného nativního monomeru, který je schopný se navázat na membránu cílové buňky obsahující fosfatidylcholin nebo sfingomyelin a cholesterol. Po vytvoření vazby začne oligomerizovat do podoby heptameru, který ale ještě není schopný vytvořit transmembránový kanál, ten se otevírá až po vnoření pórtvorné domény (Valeva et al. 1997).

Vazba na membránu má nejdůležitější roli, pravděpodobně je zprostředkována přes receptor, ale ten se ještě nepodařilo identifikovat. Toxin se neváže na buňku, jejíž membrána obsahuje fosfatidyletanolamin a fosfatidylglycerol, protože v takových membránách toxin nedokáže integrovat pórtvornou doménu. Oligomerizace vede k tvorbě dostatečně velké hydrofobní struktury k udržení stabilní polohy uvnitř dvojvrstvy. Oligomerizace se zdá být upřednostňována před laterální difuzí jednotlivých již zanořených monomerů. Nejméně známým jevem v celkovém působení α -HL je inserce kmenové domény do dvojvrstvy (Galdiero et al. 2007).

V membráně se po vnoření pórtvorné domény vytvoří neselektivní kanál, schopný přenášet molekuly do M_r 4000, jež má například Dextran 4, který už neprojde skrze pór a tím

se zablokuje hemolýza (Bhakdi et al. 1984). Vzhledem k vyřešené struktuře, výborné stabilitě (odolnost vůči změnám teploty a pH, přítomnosti SDS) a jeho všestrannosti se s ním začalo pracovat in vitro jako s nanopórem umožňujícím sledovat translokaci částic jako jsou ionty kovů (Braha et al. 2000), malé organické molekuly (Gu et al. 1999), RNA (Japrun et al. 2010), DNA (Howorka et al. 2001) a proteiny (Movileanu et al. 2000).

4.2 Nanopórové sekvenování

Po popisu struktury α -HL bych se rád zaměřil na jeho momentálně nejrozšířenější a už i komerčně využívanou aplikaci – sekvenování pomocí nanopórů, jehož velmi nedávné zavedení na trh vedlo ke snížení nákladů za sekvenaci celého jednoho genomu na 1000 USD. Sekvenovat se dají DNA i RNA. Při jejich sekvenování je nutné, aby nukleové kyseliny byly jednovláknové.

Tato metoda sekvenování je založena na identifikaci každé báze, která prochází skrz pór. Aby bylo dosaženo dobrých výsledků při čtení vlákna, je nutné dodržet několik podmínek. Vlákno musí být schopno se přiblížit k detekčnímu systému, aby mohlo být zachyceno a následně prošlo pórem. Základními předpoklady pro správné zpracování vlákna a jeho přečtení jsou následující: (i) každý nukleotid procházející skrz pór musí vytvořit zaznamatelnou jedinečnou krátkodobou blokaci průchodu elektrického proudu vyvolaného protékajícími ionty; (ii) vnitřní prostor póru musí mít takovou velikost, aby se v něm držel pouze jeden nukleotid v daném čase; (iii) rychlost měření a sběru dat musí být tak vysoká, aby bylo možno zachytit hodnotu iontového proudu probíhajícího kolem nukleotidu v okamžiku jeho vazby s přenašečem; (iv) je nezbytně nutné zamezit zpětnému chodu vlákna skrze pór; (v) membrána i kanál, ve kterých probíhá měření, musí být dostatečně odolné, aby vydržely chemické a teplotní změny prostředí nutné pro odstranění sekundární struktury (denaturaci) analyzovaného vlákna (Thompson a Oliver 2012).

4.2.1 Biologické nanopóry

Jako biologické nanopóry se používají pórtvorné toxiny buď v původní divoké formě, nebo s mutacemi. Jako nejvhodnější se osvědčil α -HL (Kasianowicz et al. 1996), protože tvoří transmembránový kanál, který propouští jednovláknovou DNA (ssDNA), ale nikoliv dvouvláknovou DNA (dsDNA). Není ovšem použit v divoké formě, ale je upraven mutacemi, aby se upravil vnitřní rozměr póru. Tento protein se za normálních podmínek váže na lipidickou dvojvrstvu. Ta má omezenou životnost, je s ní náročná manuální práce, není

odolná vůči chemickým a teplotním výkyvům. Proto musela být pro komerční využití nahrazena odolnější alternativou (viz níže) (Howorka et al. 2001).

Aby byl výstupní signál zaznamenatelem detektorem a výstupní data použitelná, je translokace DNA zpomalena zvýšením viskozity roztoku, koncentrací použitých solí nebo změnou kationtů v roztoku.

4.2.2 Nanopóry v pevné membráně

Jako základní materiál pro tvorbu pevné membrány se používají deriváty křemíku, především nitrid křemičitý (Si_3N_4). Na rozdíl od lipidové dvojvrstvy jsou tyto pevné membrány odolnější vůči měnícím se podmínkám při sekvenování skrz nanopóry a umožňují kvalitní sběr dat. Rychlost translokace vlákna DNA o velikosti 93 kpb přes nanopór v pevné membráně je cca 10 kb/ms (rychlost vlákna, které je volně přenášeno nanopórem za pomoci vkládaného elektrického napětí). Tato rychlost přesahuje citlivost detektorů snímání proudu, proto bylo nutné ji zpomalit použitím upravených pórtvorných proteinů, které jsou zanořované do pevné křemičité membrány (viz níže) (Healy et al. 2007).

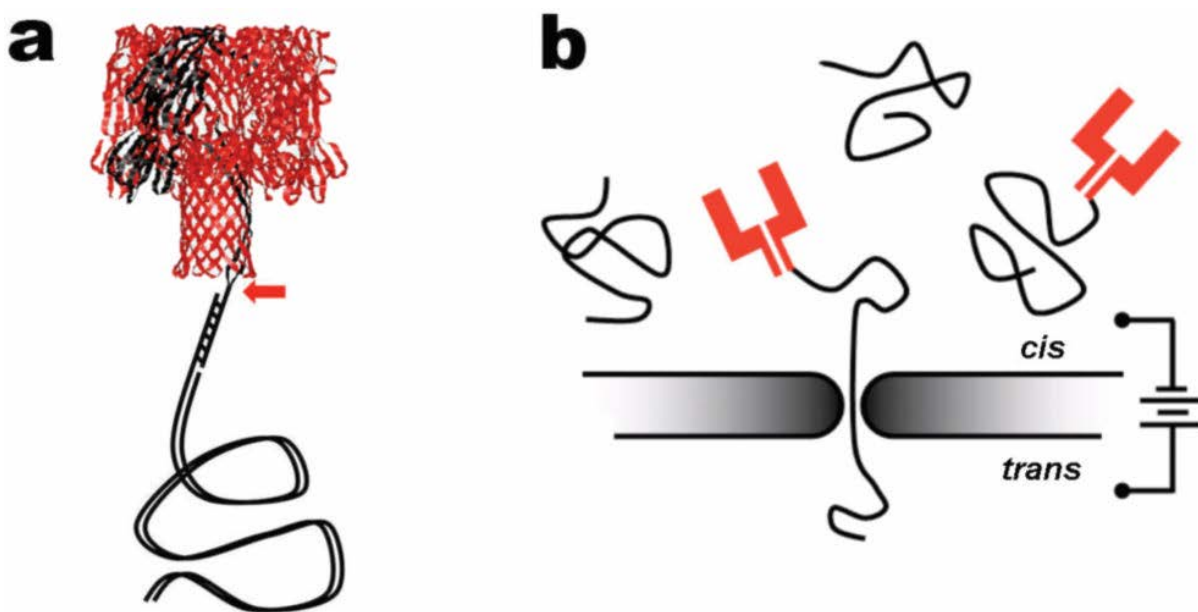
4.2.3 Hybridní nanopóry

Hybridní nanopóry vznikají vložením jednotlivých, předem sestavených α -hemolysinů do nanopóru vyrobeného v pevné membráně. Monomer α -hemolysinu je modifikován přidáním 11 aminokyselin dlouhou smyčkou (loopem) na výběžek β -barelu. Smyčka nese vazebné místo obsahující cystein, na který se disulfidickým můstkem váže 12 bází dlouhý DNA oligomer, který tvoří vazebný bod pro 3 kbp dlouhou dsDNA molekulu s komplementárním jednovláknovým koncem. Tato navázaná dsDNA je nezbytná pro zavedení α -HL do membrány. dsDNA je za pomoci elektrického napětí translokována skrze pór v pevné membráně a ta za sebou táhne i α -HL, který se po translokování celého vlákna navázané dsDNA zastaví přímo na membráně, protože čepička proteinu neprojde úzkým nanopórem. Nezbytné je dodržet velikost nanopóru v membráně a to v rozmezí 2,4 - 3,6 nm, která je dostatečně velká, aby jím prošla molekula dsDNA a kmen α -HL, a přitom dostatečně malá, aby jím už nedokázala projít čepička proteinu. Tímto způsobem se dá docílit, aby čepička směřovala na cis stranu (strana s molekulami určenými k translokaci) membrány a β -barel ústil na trans straně (strana, kam jsou molekuly translokovány) membrány (Obr. 9). Tomuto jevu napomáhá i to, že α -hemolysin představuje sám o sobě velkou hydrodynamickou brzdu vzhledem k své obrovské velikosti a tudíž se k póru v membráně přiblíží, teprve když je

translokována celá molekula dsDNA. Následná sekvenace už pracuje se ssDNA, které se přidají na cis stranu (Hall et al. 2010).

4.2.3.1 *Mutace α -hemolysinu pro import do křemíkové membrány*

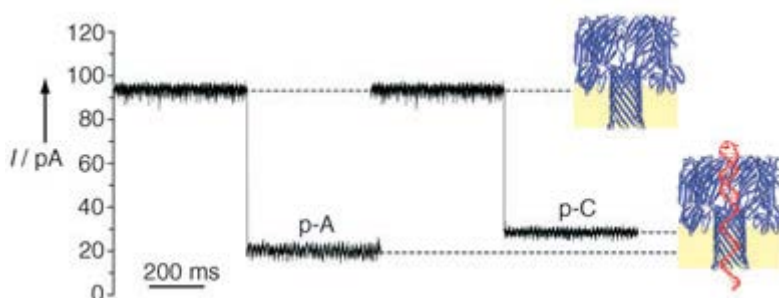
Monomer α -hemolysinu je produkován s 11 aminokyselin dlouhou smyčkou obsahující cystein (GGSSGCGSSGG), která nahrazuje residuum 129 a na C-konec je přidáno 8 molekul aspartátu. Tyto monomery jsou smíchány s monomery mutanty α -hemolysinu M113N, která na pozici Met¹¹³ nese záměnu za Asn. U této mutanty α -hemolysinu dochází k zadržení molekuly v lumen kanálu až na stovky milisekund (Gu et al. 2001). Vzniklý heteroheptamerní proteinový pór se pak vytvoří na buněčných membránách králíčích červených krvinek. Proteiny navázané na membránu jsou poté separovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), aby se získaly póry s podjednotkami v poměru 1:6 (α -hemolysinCys : α -hemolysinM113N), které jsou extrahovány přímo z gelu (Bayley a Jayasinghe 2004; Howorka et al. 2001).



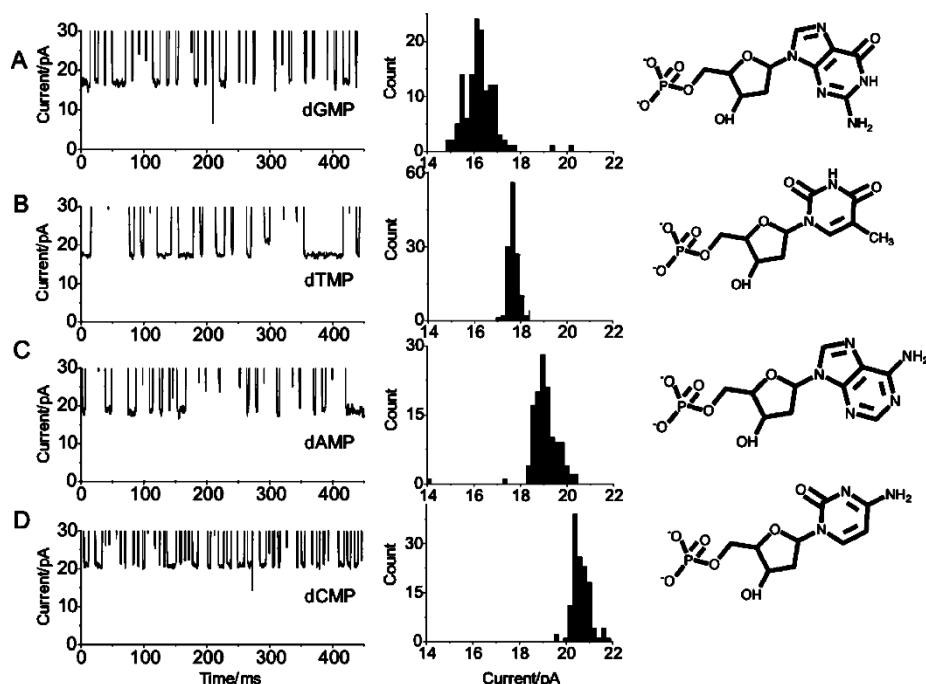
Obr. 9 Příprava hybridních nanopórů. (a) α -HL heteroheptamer s navázaným 12 bází dlouhým oligomerem, na který je navázaná dsDNA, která (b) navede α -HL do póru v pevné membráně a protein se v něm zastaví, protože jeho čepička neprojde pórem (Hall et al. 2010).

4.2.4 Detekce a záznam signálu

Detekce signálu během sekvenace probíhá měřením elektrického proudu vyvolaného tokem monovalentních iontů přes pórotvorný protein. Měření proudu probíhá s frekvencí 100 kHz, aby byly zachyceny všechny báze translokované ssDNA. Při této detekci se sledují pouze dva stavy proteinu - otevřený a blokový (Obr. 10). Při otevřeném stavu dochází k proudu iontů limitovaným pouze vlastnostmi měřicí aparatury a prostředím (vysoký vodivostní stav). Při blokováném stavu dochází k blokaci proudu iontů (skokový pokles proudu) procházející molekulou (Gu et al. 1999). Tento rozdíl se detekuje a slouží jako unikátní poznávací znak pro jednotlivé molekuly (Obr. 11). Měření v konkrétních podmínkách se zjistilo, že hodnota elektrického proudu pro báze je následující: guanin má v záznamu hodnotu 16.2 ± 0.5 pA, thymin 17.6 ± 0.6 pA, adenin 18.6 ± 0.6 pA a cytosin 20.2 ± 0.5 pA (Ashkenasy et al. 2005; Astier et al. 2006).



Obr. 10 Otevřený stav (vysoký proud) a blokový stav (skokový pokles proudu) a jeho projev na záznamu elektrického proudu v čase (Ashkenasy et al. 2005).



Obr. 11 Hodnoty elektrického proudu procházející pórem pro jednotlivé nukleotidy. Při translokaci bází dochází k blokaci elektrického proudu a zjišťují se dva stavy – otevřeno a blokováno. Při otevřeném stavu je pór volně průchozí pro proud a při blokováném stavu je v póru navázaná báze. V grafech v levém sloupci jsou zobrazeny blokové stavy, které snižují hodnotu proudu. V prostředním sloupci jsou histogramy četnosti hodnoty blokováného proudu, z nichž se odvodila hodnota blokace proudu pro všechny jednotlivé báze (Astier et al. 2006).

4.3 Antraxový toxin

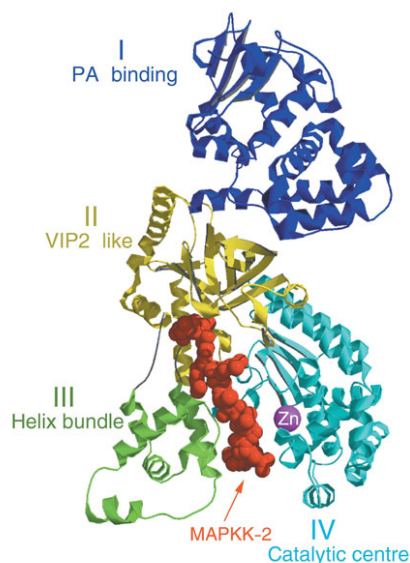
Toxin je produkován bakterií *Bacillus anthracis*, původcem onemocnění antrax. Toxin je složený ze tří proteinů: protektivní antigen (PA), smrtící faktor (lethal factor – LF) a edémový faktor (edema factor – EF). LF a EF mají enzymatickou aktivitu a PA se váže na cílovou buňku. EF je kalmulin dependentní adenylát cykláza, která se pro aktivaci musí dostat do cytosolu napadené buňky. LF je zinek dependentní proteáza, která štěpí kinázy aktivované mitogenem. Tyto tři části jsou kódovány na plasmidu pXO1, ale jsou syntetizovány a sekretovány zvlášť (Brossier et al. 2000).

Toxin se váže na receptor - von Willebrandův faktor domény A lidského proteinu pro morfogenezi kapilár 2 (Bradley et al. 2001). Vazbu na receptor zajišťuje PA, který musí projít proteolýzou v oblasti residuí 164-167, kde furin rozeznává sekvenci Arg¹⁶⁴-Lys¹⁶⁵-Lys¹⁶⁶-Arg¹⁶⁷, aby se mohla správně navázat na receptor a vytvořit v membráně heptamer pro následnou translokaci LF a EF (Klimpel et al. 1992). Monomer je tvořen ze 4 domén (Obr. 12). PA je díky své schopnosti přenášet různé molekuly využitelný jako základní transportní systém in vitro (Petosa et al. 1997).

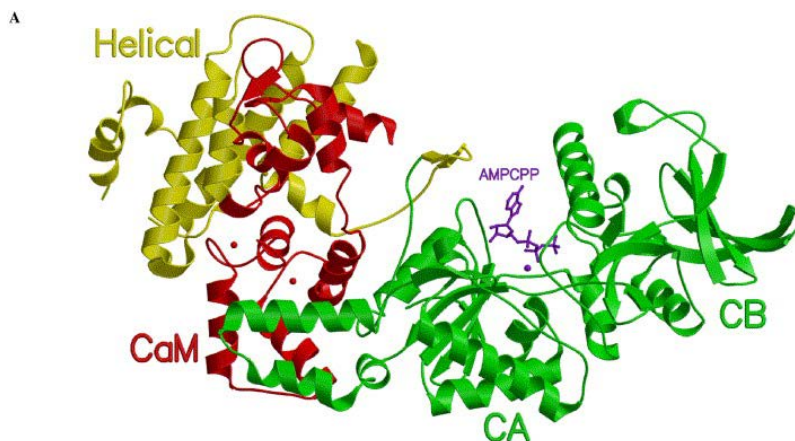


Obr. 12 Protektivní antigen a jeho čtyři domény: doména 1 (modrá) má aktivní místo pro proteolytickou aktivaci; doména 2 (zelená) zprostředkovává heptamerizaci a podílí se na inzerci do membrány; doména 3 (žlutá) má neznámou funkci a doména 4 (červená) je receptor vazebná doména (PDB 1ACC) (Petosa et al. 1997).

PA tvoří v kombinaci s EF edémový toxin a v kombinaci s LF letální toxin. V obou komplexech funguje PA jako receptor vazebná a pórtvorná doména, zatímco LF a EF jsou doménami s toxickou aktivitou (Brossier et al. 2000). Virulenční faktory se do cílové buňky dostávají přes vazbu na PA, který už je proteolyticky aktivovaný, navázaný na receptor a oligomerizovaný. Následuje endocytóza zprostředkovaná receptorem a nízké pH v endosomu způsobí konformační změnu PA, která umožní translokaci faktorů do cytosolu buňky (Obr. 13 a 14) (Collier 1999). EF má katalytickou doménu velmi podobnou adenylát-cyklázové doméně CyaA (*B. pertussis*) a tedy váže kalmodulin a katalyzuje tvorbu cAMP. Na druhou stranu LF štěpí N-konec MAP kináz (MAPKK1 a MAPKK2), což má za následek inhibici signální dráhy MAPK (Brossier et al. 2000).



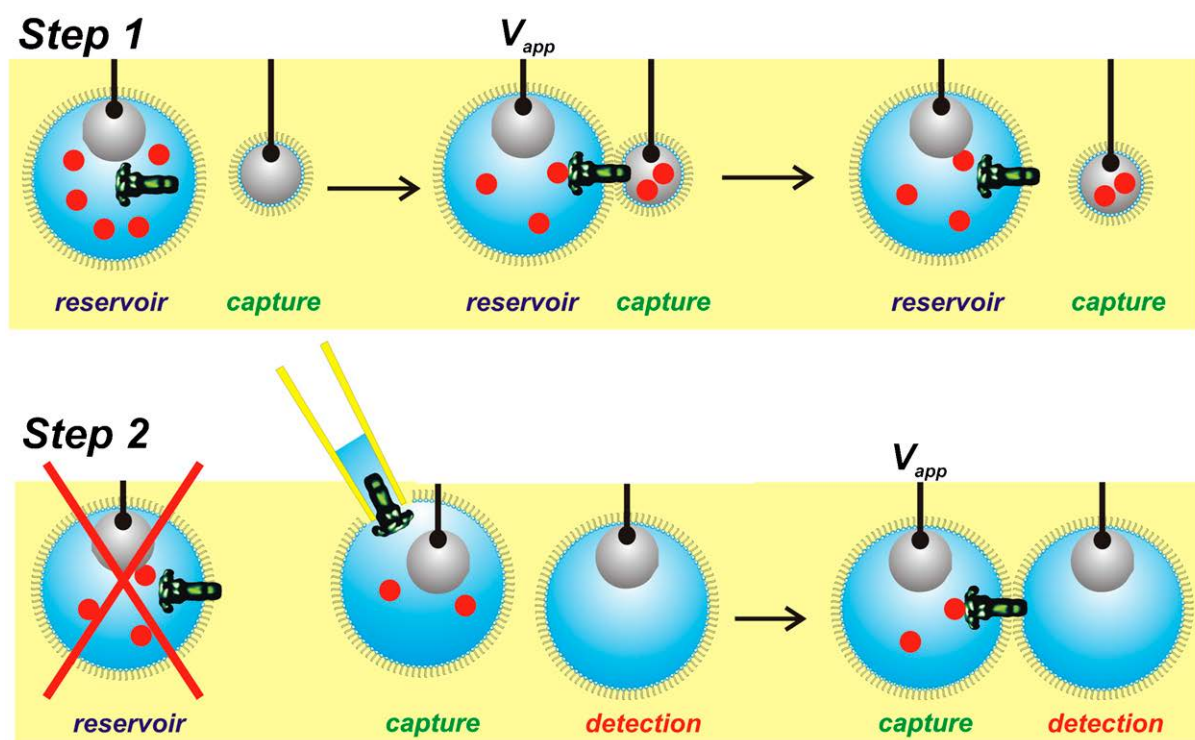
Obr. 13 Struktura LF a jeho čtyř domén: doména 1 (modrá) váže translokační doménu PA; doména 2 (žlutá) se podobá ADP-ribosylačnímu toxinu *Bacillus cereus*; doména 3 (zelená) je vsunuta do domény 2 jako strukturní duplikát její části; doména 4 (světle modrá) je podobná zinek dependentní proteáze (navázaný zinek je označen fialově) a obsahuje aktivní katalytické místo s navázanou MAPK kinázou (červeně) (Pannifer et al. 2001).



Obr. 14 Struktura EF se třemi doménami – jedna helikální (žlutá) a dvě subdomény (zelená CA a CB), které tvoří katalytické centrum; mezi doménami CA a helikální doménou je navázan CaM (červená). Mezi doménami CA a CB je aktivní místo tvořené navázaným analogem 3'-deoxy-ATP (v tomto případě AMPCPP - Adenosin 5'-(α,β -metylen)-trifosfát) (Shen et al. 2004).

PA se díky svým vlastnostem přenašeče molekul využívá při výzkumu translokace in vitro. Využívá se při výzkumu na černých lipidických membránách (BLM) anebo na membránové dvojvrstvě vytvořené na rozhraní kapiček hydrogelu (DIB). Obě tyto metody spočívají ve

vytvoření umělé lipidické membrány mezi dvěma prostředími, do kterých jsou zavedeny elektrody, které elektroforeticky přenáší látky ze strany cis na stranu trans. V membráně je třeba vytvořit pór, kterým by molekuly procházely a my bychom mohli měřit četnost, vlastnosti anebo rychlost přenosu. BLM je systém, kde jsou dva oddíly kyvety spojeny malým otvorem, ve kterém vytvoříme planární lipidovou membránu, jejíž složení si navolíme podle experimentu. DIB je systém využívající vzniku monovrstvy lipidů na povrchu kapičky, která po kontaktu s druhou kapičkou vytvoří dvojvrstvu na jejich rozhraní (Obr. 15). Mezi nejčastěji využívané toxiny pro přenos molekul skrz pór patří PA, CyaA a α -HL (Fischer et al. 2011).



Obr. 15 Schéma experimentu s antraxovým toxinem v DIB systému. Krok 1: elektrody jsou obaleny v 2% agarose (šedá) a jsou ponořeny do roztoku lipidů v hexadekanu (žlutá), zásobní kapička („reservoir“) obsahuje PA (černá) a LF (červená), po kontaktu s další prázdnou kapičkou („capture“) se na rozhraní mezi nimi vytvoří dvojvrstva, do které se zanoří PA. Následuje translokace LF poháněná membránovým potenciálem a poté jsou kapičky zase odděleny. Krok 2: zásobní kapička je úplně odstraněna a do kapičky s LF je přidán PA. Dále se vytvoří nová kapička („detection“), mezi níž a kapičkou s PA a LF se vytvoří dvojvrstva. Do té se inkorpuluje PA a proběhne translokace LF, která je zaznamenána (Fischer et al. 2011).

5. Závěr

Studiu bakteriálních toxinů se věda věnuje už desítky let a stále slaví úspěchy s objevováním nových mechanismů. V této práci jsem stručně shrnul znalosti o mechanismech translokace bakteriálních toxinů přes membránu eukaryotických buněk a jejich aplikace. V práci jsem se věnoval základnímu rozdělení translokace podle struktury bakteriálních toxinů. Tyto mechanismy je nutné nadále studovat a odhalovat, protože díky získaným znalostem se mohou vyrábět účinnější protilátky pro léčbu nemocí, které způsobují. A zároveň jejich in vitro použití usnadní a urychlí analýzu dlouhých molekulových řetězců, které mohou být translokovány těmito systémy. Kromě v této práci zmiňované sekvenace nukleových kyselin se translokace skrz nanopóry za použití měření proudu procházejícího pórem dá využít i pro „hmotnostní spektrometrii“ (Robertson et al. 2007).

6. Použitá literatura

- Arab, S., and C. A. Lingwood. 1998. "Intracellular Targeting of the Endoplasmic Reticulum Nuclear Envelope by Retrograde Transport May Determine Cell Hypersensitivity to Verotoxin via Globotriaosyl Ceramide Fatty Acid Isoform Traffic." *Journal of Cellular Physiology* 177 (4): 646–60. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199812)177:4<646::AID-JCP15>3.0.CO;2-B.
- Ashkenasy, N., J. Sanchez-Quesada, H. Bayley, and M. R. Ghadiri. 2005. "Recognizing a Single Base in an Individual DNA Strand: A Step toward DNA Sequencing in Nanopores." *Angewandte Chemie-International Edition* 44 (9): 1401–4. doi:10.1002/anie.200462114.
- Astier, Y., O. Braha, and H. Bayley. 2006. "Toward Single Molecule DNA Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5'-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped with a Molecular Adapter." *Journal of the American Chemical Society* 128 (5): 1705–10. doi:10.1021/ja057123+.
- Barry, Em, Aa Weiss, Ie Ehrmann, Mc Gray, El Hewlett, and Ms Goodwin. 1991. "Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase Toxin and Hemolytic Activities Require a 2nd Gene, Cyac, for Activation." *Journal of Bacteriology* 173 (2): 720–26.
- Bayley, H., and L. Jayasinghe. 2004. "Functional Engineered Channels and Pores - (Review)." *Molecular Membrane Biology* 21 (4): 209–20. doi:10.1080/09687680410001716853.
- Bhakdi, S., and J. Tranum-Jensen. 1991. "Alpha-Toxin of Staphylococcus Aureus." *Microbiological Reviews* 55 (4): 733–51.
- Bhakdi, S., M. Muhly, and R. Fussle. 1984. "Correlation Between Toxin Binding and Hemolytic-Activity in Membrane Damage by Staphylococcal Alpha-Toxin." *Infection and Immunity* 46 (2): 318–23.
- Bradley, K. A., J. Mogridge, M. Mourez, R. J. Collier, and J. a. T. Young. 2001. "Identification of the Cellular Receptor for Anthrax Toxin." *Nature* 414 (6860): 225–29. doi:10.1038/n35101999.
- Braha, O., L. Q. Gu, L. Zhou, X. F. Lu, S. Cheley, and H. Bayley. 2000. "Simultaneous Stochastic Sensing of Divalent Metal Ions." *Nature Biotechnology* 18 (9): 1005–7. doi:10.1038/79275.
- Brossier, F., M. Weber-Levy, M. Mock, and J. C. Sirard. 2000. "Role of Toxin Functional Domains in Anthrax Pathogenesis." *Infection and Immunity* 68 (4): 1781–86. doi:10.1128/IAI.68.4.1781-1786.2000.
- Bumba, Ladislav, Jiri Masin, Radovan Fiser, and Peter Sebo. 2010. "Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Mobilizes Its β 2 Integrin Receptor into Lipid Rafts to Accomplish Translocation across Target Cell Membrane in Two Steps." *PLoS Pathog* 6 (5): e1000901. doi:10.1371/journal.ppat.1000901.
- Collier, R. J. 1999. "Mechanism of Membrane Translocation by Anthrax Toxin: Insertion and Pore Formation by Protective Antigen." *Journal of Applied Microbiology* 87 (2): 283–283. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00889.x.
- Eby, Joshua C., William P. Ciesla, Wendy Hamman, Gina M. Donato, Raymond J. Pickles, Erik L. Hewlett, and Wayne I. Lencer. 2010. "Selective Translocation of the Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin across the Basolateral Membranes of Polarized Epithelial Cells." *Journal of Biological Chemistry* 285 (14): 10662–70. doi:10.1074/jbc.M109.089219.
- Falnes, P. O., and K. Sandvig. 2000. "Penetration of Protein Toxins into Cells." *Current Opinion in Cell Biology* 12 (4): 407–13. doi:10.1016/S0955-0674(00)00109-5.

- Falnes, Po, S. Choe, Ih Madshus, Ba Wilson, and S. Olsnes. 1994. "Inhibition of Membrane Translocation of Diphtheria-Toxin-a Fragment by Internal Disulfide Bridges." *Journal of Biological Chemistry* 269 (11): 8402–7.
- Fischer, Audrey, Matthew A. Holden, Brad L. Pentelute, and R. John Collier. 2011. "Ultrasensitive Detection of Protein Translocated through Toxin Pores in Droplet-Interface Bilayers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (40): 16577–81. doi:10.1073/pnas.1113074108.
- Fraser, M. E., M. Fujinaga, M. M. Cherney, A. R. Melton-Celsa, E. M. Twiddy, A. D. O'Brien, and M. N. G. James. 2004. "Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from Escherichia Coli O157 : H7." *Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 27511–17. doi:10.1074/jbc.M401939200.
- Galdiero, Stefania, Massimiliano Galdiero, and Carlo Pedone. 2007. "Beta-Barrel Membrane Bacterial Proteins: Structure, Function, Assembly and Interaction with Lipids." *Current Protein & Peptide Science* 8 (1): 63–82. doi:10.2174/138920307779941541.
- Garred, O., B. Vandeurs, and K. Sandvig. 1995. "Furin-Induced Cleavage and Activation of Shiga Toxin." *Journal of Biological Chemistry* 270 (18): 10817–21.
- Gouaux, Je, O. Braha, Mr Hobaugh, Lz Song, S. Cheley, C. Shustak, and H. Bayley. 1994. "Subunit Stoichiometry of Staphylococcal Alpha-Hemolysin in Crystals And." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (26): 12828–31. doi:10.1073/pnas.91.26.12828.
- Gu, L. Q., O. Braha, S. Conlan, S. Cheley, and H. Bayley. 1999. "Stochastic Sensing of Organic Analytes by a Pore-Forming Protein Containing a Molecular Adapter." *Nature* 398 (6729): 686–90.
- Gu, L. Q., S. Cheley, and H. Bayley. 2001. "Capture of a Single Molecule in a Nanocavity." *Science* 291 (5504): 636–40. doi:10.1126/science.291.5504.636.
- Guermonprez, P., N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. Ricciardi-Castagnoli, N. Guiso, D. Ladant, and C. Leclerc. 2001. "The Adenylate Cyclase Toxin of Bordetella Pertussis Binds to Target Cells via the alpha(M)beta(2) Integrin (CD11b/CD18)." *Journal of Experimental Medicine* 193 (9): 1035–44. doi:10.1084/jem.193.9.1035.
- Hall, Adam R., Andrew Scott, Dvir Rotem, Kunal K. Mehta, Hagan Bayley, and Cees Dekker. 2010. "Hybrid Pore Formation by Directed Insertion of Alpha-Haemolysin into Solid-State Nanopores." *Nature Nanotechnology* 5 (12): 874–77. doi:10.1038/NNANO.2010.237.
- Hayashibara, Masatoshi, and Erwin London. 2005. "Topography of Diphtheria Toxin A Chain Inserted into Lipid Vesicles." *Biochemistry* 44 (6): 2183–96. doi: 10.1021/bi0482093
- Healy, Ken, Birgitta Schiedt, and Alan P. Morrison. 2007. "Solid-State Nanopore Technologies for Nanopore-Based DNA Analysis." *Nanomedicine* 2 (6): 875–97. doi:10.2217/17435889.2.6.875.
- Holmgren, J., I. Lonnroth, Je Mansson, and L. Svennerholm. 1975. "Interaction of Cholera Toxin and Membrane Gm1 Ganglioside of Small-Intestine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (7): 2520–24. doi:10.1073/pnas.72.7.2520.
- Howorka, S., S. Cheley, and H. Bayley. 2001. "Sequence-Specific Detection of Individual DNA Strands Using Engineered Nanopores." *Nature Biotechnology* 19 (7): 636–39. doi:10.1038/90236.
- Japrun, Deanpen, Marsiyana Henricus, Qihong Li, Giovanni Maglia, and Hagan Bayley. 2010. "Urea Facilitates the Translocation of Single-Stranded DNA and RNA Through the Alpha-Hemolysin Nanopore." *Biophysical Journal* 98 (9): 1856–63. doi:10.1016/j.bpj.2009.12.4333.

- Kasianowicz, J. J., E. Brandin, D. Branton, and D. W. Deamer. 1996. "Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24): 13770–73. doi:10.1073/pnas.93.24.13770.
- Klimpel, Kr, Ss Molloy, G. Thomas, and Sh Leppla. 1992. "Anthrax Toxin Protective Antigen Is Activated by a Cell-Surface Protease with the Sequence Specificity and Catalytic Properties of Furin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21): 10277–81. doi:10.1073/pnas.89.21.10277.
- Kumaran, Desigan, Subramaniam Eswaramoorthy, William Furey, Jorge Navaza, Martin Sax, and Subramanyam Swaminathan. 2009. "Domain Organization in Clostridium Botulinum Neurotoxin Type E Is Unique: Its Implication in Faster Translocation." *Journal of Molecular Biology* 386 (1): 233–45. doi:10.1016/j.jmb.2008.12.027.
- Lacy, D. B., W. Tepp, A. C. Cohen, B. R. DasGupta, and R. C. Stevens. 1998. "Crystal Structure of Botulinum Neuro-Toxin Type A and Implications for Toxicity." *Nature Structural Biology* 5 (10): 898–902. doi:10.1038/2338.
- Lanzrein, M., O. Sand, and S. Olsnes. 1996. "GPI-Anchored Diphtheria Toxin Receptor Allows Membrane Translocation of the Toxin without Detectable Ion Channel Activity." *Embo Journal* 15 (4): 725–34.
- Leka, Oneda, Francesca Vallese, Marco Pirazzini, Paola Berto, Cesare Montecucco, and Giuseppe Zanotti. 2014. "Diphtheria Toxin Conformational Switching at Acidic pH." *FEBS Journal* 281(9): 2115–22. doi: 10.1111/febs.12783
- Lindberg, Aa, Je Brown, N. Stromberg, M. Westlingryd, Je Schultz, and Ka Karlsson. 1987. "Identification of the Carbohydrate Receptor for Shiga Toxin Produced by Shigella-Dysenteriae Type-1." *Journal of Biological Chemistry* 262 (4): 1779–85.
- Mallard, F., C. Antony, D. Tenza, J. Salamero, B. Goud, and L. Johannes. 1998. "Direct Pathway from Early/recycling Endosomes to the Golgi Apparatus Revealed through the Study of Shiga Toxin B-Fragment Transport." *Journal of Cell Biology* 143 (4): 973–90. doi:10.1083/jcb.143.4.973.
- Manara, Richard M. A., Susana Tomasio, and Syma Khalid. 2015. "The Nucleotide Capture Region of Alpha Hemolysin: Insights into Nanopore Design for DNA Sequencing from Molecular Dynamics Simulations." *Nanomaterials* 5 (1): 144–53. doi:10.3390/nano5010144.
- Matsui, Tsutomu, Shenyan Gu, Kwok-ho Lam, Lester G. Carter, Andreas Rummel, Irimpan I. Mathews, and Rongsheng Jin. 2014. "Structural Basis of the pH-Dependent Assembly of a Botulinum Neurotoxin Complex." *Journal of Molecular Biology* 426 (22): 3773–82. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.009.
- Movileanu, L., S. Howorka, O. Braha, and H. Bayley. 2000. "Detecting Protein Analytes That Modulate Transmembrane Movement of a Polymer Chain within a Single Protein Pore." *Nature Biotechnology* 18 (10): 1091–95.
- Murphy, John R. 2011. "Mechanism of Diphtheria Toxin Catalytic Domain Delivery to the Eukaryotic Cell Cytosol and the Cellular Factors That Directly Participate in the Process." *Toxins* 3 (3): 294–308. doi:10.3390/toxins3030294.
- Naglich, Jg, Je Metherrall, Dw Russell, and L. Eidels. 1992. "Expression Cloning of a Diphtheria-Toxin Receptor - Identity with a Heparin-Binding Egf-Like Growth-Factor Precursor." *Cell* 69 (6): 1051–61. doi:10.1016/0092-8674(92)90623-K.
- Noel, Romain, Neetu Gupta, Valerie Pons, Amelie Goudet, Maria Daniela Garcia-Castillo, Aurelien Michau, Jennifer Martinez, et al. 2013. "N-Methyldihydroquinazolinone Derivatives of Retro-2 with Enhanced Efficacy against Shiga Toxin." *Journal of Medicinal Chemistry* 56 (8): 3404–13. doi:10.1021/jm4002346.

- Otero, As, Xb Yi, Mc Gray, G. Szabo, and El Hewlett. 1995. "Membrane Depolarization Prevents Cell Invasion by Bordetella-Pertussis Adenylate-Cyclase Toxin." *Journal of Biological Chemistry* 270 (17): 9695–97.
- Pannifer, A. D., T. Y. Wong, R. Schwarzenbacher, M. Renatus, C. Petosa, J. Bienkowska, D. B. Lacy, et al. 2001. "Crystal Structure of the Anthrax Lethal Factor." *Nature* 414 (6860): 229–33. doi:10.1038/n35101998.
- Petosa, C., R. J. Collier, K. R. Klimpel, S. H. Leppla, and R. C. Liddington. 1997. "Crystal Structure of the Anthrax Toxin Protective Antigen." *Nature* 385 (6619): 833–38. doi:10.1038/385833a0.
- Robertson, Joseph W. F., Claudio G. Rodrigues, Vincent M. Stanford, Kenneth A. Robinson, Oleg V. Krasilnikov, and John J. Kasianowicz. 2007. "Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (20): 8207–11. doi: 10.1073/pnas.0611085104
- Rogel, A., and E. Hanski. 1992. "Distinct Steps in the Penetration of Adenylate-Cyclase Toxin of Bordetella-Pertussis into Sheep Erythrocytes - Translocation of the Toxin Across the Membrane." *Journal of Biological Chemistry* 267 (31): 22599–605.
- Schiavo, G., F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, Pp Delaureto, Br Dasgupta, and C. Montecucco. 1992. "Tetanus and Botulinum-B Neurotoxins Block Neurotransmitter Release by Proteolytic Cleavage of Synaptobrevin." *Nature* 359 (6398): 832–35. doi:10.1038/359832a0.
- Shen, Yuequan, Qing Guo, Natalia L. Zhukovskaya, Chester L. Drum, Andrew Bohm, and Wei-Jen Tang. 2004. "Structure of Anthrax Edema Factor–calmodulin–adenosine 5'-(α,β -Methylene)-Triphosphate Complex Reveals an Alternative Mode of ATP Binding to the Catalytic Site." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317 (2): 309–14. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.046.
- Silverman, Ja, Ja Mindell, H. Zhan, A. Finkelstein, and Rj Collier. 1994. "Structure-Function-Relationships in Diphtheria-Toxin Channels .1. Determining a Minimal Channel-Forming Domain." *Journal of Membrane Biology* 137 (1): 17–28.
- Song, L. Z., M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux. 1996. "Structure of Staphylococcal Alpha-Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore." *Science* 274 (5294): 1859–66. doi:10.1126/science.274.5294.1859.
- Thompson, John F., and John S. Oliver. 2012. "Mapping and Sequencing DNA Using Nanopores and Nanodetectors." *Electrophoresis* 33 (23): 3429–36. doi:10.1002/elps.201200136.
- Torgersen, M. L., S. U. Lauvrak, and K. Sandvig. 2005. "The A-Subunit of Surface-Bound Shiga Toxin Stimulates Clathrin-Dependent Uptake of the Toxin." *Febs Journal* 272 (16): 4103–13. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04835.x.
- Uribe, Kepa B., Aitor Etxebarria, Cesar Martin, and Helena Ostolaza. 2013. "Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain." *Plos One* 8 (6): e67648. doi:10.1371/journal.pone.0067648.
- Valeva, A., I. Walev, M. Pinkernell, B. Walker, H. Bayley, M. Palmer, and S. Bhakdi. 1997. "Transmembrane Beta-Barrel of Staphylococcal Alpha-Toxin Forms in Sensitive but Not in Resistant Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (21): 11607–11. doi:10.1073/pnas.94.21.11607.
- Veneziano, Remi, Claire Rossi, Alexandre Chenal, Jean-Marie Devoisselle, Daniel Ladant, and Joel Chopineau. 2013. "Bordetella Pertussis Adenylate Cyclase Toxin Translocation across a Tethered Lipid Bilayer." *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America* 110 (51): 20473–78. doi:10.1073/pnas.1312975110.
- Windschiegel, Barbara, Alexander Orth, Winfried Roemer, Ludwig Berland, Bahne Stechmann, Patricia Bassereau, Ludger Johannes, and Claudia Steinem. 2009. “Lipid Reorganization Induced by Shiga Toxin Clustering on Planar Membranes.” *Plos One* 4 (7): e6238. doi:10.1371/journal.pone.0006238.
- Yu, Min, and David B. Haslam. 2005. “Shiga Toxin Is Transported from the Endoplasmic Reticulum Following Interaction with the Luminal Chaperone HEDJ/ERdj3.” *Infection and Immunity* 73 (4): 2524–32. doi:10.1128/IAI.73.4.2524-2532.2005.